6

动 物 学 研 究 1999, Oct. 20 (5): 347~351 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

光照和温度对高原鼠兔褐色脂肪组织产热特征的影响

王德华[①] 孙儒泳[②] 王祖望[①]
(①中国科学院动物研究所农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080 wangdh@panda.ioz.ac.cn)
(②北京师范大学生物系 北京 100875)

摘要：测定了高原鼠兔（*Ochotona curzoniae*）在驯化2周后（分4种处理：23℃，16 L：8 D；23℃，8 L：16 D；5℃，16 L：8 D和5℃，8 L：16 D）褐色脂肪组织（BAT）的蛋白含量、线粒体蛋白含量和细胞色素c氧化酶活性的变化。结果表明，低温或短光照可刺激这些指标的增加；最高值出现在低温加短光照组。说明在季节性驯化过程中，光照和温度协同作用，以诱导动物的产热调节。这与高原鼠兔群居性差、不筑巢的行为习性、栖息于开阔的矮蒿草草甸以及高寒地区的昼夜温差较大、气候多变等因素有关。

关键词：高原鼠兔，褐色脂肪组织，线粒体 光照 温度
中图分类号：Q959.836 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(1999)-05-0347-05

非颤抖性产热（nonshivering thermogenesis, NST）是小型哺乳动物的一种重要产热方式，而褐色脂肪组织（brown adipose tissue, BAT）是NST的主要产热源（王德华等，1992）。研究诱导NST变化的环境因子，对于理解小型哺乳动物在严寒季节的生存能力及适应策略是非常必要的。在季节性驯化过程中，NST伴随着环境温度、光照长度、取食质量和数量等各种生态因子的变化而变化。在这些因子中，光周期较稳定又可预测，可以对动物适应环境提供较为准确的季节变化信号。已有一些证据表明，光周期可刺激NST能力的发展（Lynch 等，1978；Haim 等，1980，1982；Heldmaier 等，1982）、BAT增加（Heldmaier 等，1981）和BAT产热活性增强等（Himms-Hagen, 1989; Horwitz, 1989; Wunder, 1984）。

虽然影响BAT功能及NST能力的研究广泛而深入，但研究多集中在实验动物上，对野外自然种群的研究仍较少，涉及兔类则更少。Hagelstein 等（1978）发现寒冷是诱发大白鼠NST能力增强的必要因素，单独短日照并不引起NST的变化。红背䶄（*Clethrionomys rutilus*）栖居于阿拉斯加寒冷地区，NST从夏季到冬季急剧增加，但单独短光照不能导致NST的增加。Feist 等（1981，1986）认为，寒冷是刺激红背䶄产热能力变化的主要因素，光周期对该鼠并不重要。这些结果与白足鼠（*Peromyscus leucopus*）（Lynch 等，1978）、黑线毛足鼠（*Phodopus sungorus*）（Heldmaier 等，1986）等截然不同，后者的BAT活性及NST能力受光周期控制，并且短光照与低温双重刺激可进一步促进NST能力的发展，保证动物安全越冬。

Wunder（1984，1985）和 Heldmaier 等（1985，1989）指出，在季节性驯化过程中，光周期是比较普遍的信号，既可使小哺乳动物预先准备抵御冬季的第1次严寒，又防止冬季温暖导致NST能力的丧失。Heldmaier 等（19:5）提出光周期可调节NST的季节变化，同时冷暴露可能进一步刺激产热能力，这样可使动物在寒冬对冷的耐受力提高到最大；Zegers 等（1988）对白足鼠的研究也提出，环境温度和光周期可能相互作用以诱导产热调节。

高原鼠兔（*Ochotona curzoniae*）是青藏高原的特有种，在季节驯化过程中NST冬季趋于增加（王德华等，1990；Wang 等，1996），BAT重量和结构具显著的季节变化（王德华等，1989，1993b）。研究发现，低温是影响高寒地区小型哺乳动物产热的重要因素（王德华等，1993a，1996）。但在野外条件下，要分离光照和环境温度的影响是比较困难的，为此我

收稿日期：1999-01-11，修改稿收到日期：1999-03-09
基金项目：国家自然科学基金资助项目（39470121）

们在实验室人工控制光照和环境温度条件下，对其产热特征进行了测定，主要解决以下问题：光照和环境温度对BAT的产热特征有何影响？导致细胞水平上哪些改变？是单独影响还是共同起作用？

1 材料与方法

1.1 实验动物

1992年7～8月，高原鼠兔成体捕自青海省贵南藏族自治州森多乡地区（海拔3 100 m）及青海湖地区（3 100～3 400 m）的矮蒿草草甸内。捕获后运回西宁，于实验室内饲养，温度为（20±1）℃，光照为12 L：12 D，喂以北京朝阳颗粒饲料厂生产的兔饲料块（粗蛋白19.4%，粗纤维14.7%，粗脂肪3.3 %），添加青菜及胡萝卜等。

对饲养2周后的鼠兔进行室内驯化实验，有如下4种处理：①高温、长光照（23℃，16 L：8 D）；②高温、短光照（23℃，8 L：16 D）；③低温、长光照（5℃，16 L：8 D）；④低温、短光照（5℃，8 L：16 D）。用不锈钢笼单只饲养，饲喂条件同上。动物驯化时间为2周。

1.2 线粒体制备

断颈杀死动物，迅速而小心地取出肩胛部BAT，放于0.25 mol/L蔗糖溶液中清洗（冰浴），然后将剪碎的组织放入Teflon匀浆器内，加入一定体积的匀浆液匀浆，于2000r/min离心7min，取上清液于10 000 r/min离心10 min，清洗1次，再于10 000 r/min离心10 min以获得线粒体，取沉淀线粒体加提取液悬浮，然后进行有关测定（Sundin等，1987；Heldmaier等，1985）。

1.3 蛋白质含量测定

以牛血清蛋白作为标准，采用Lowry等（1951）的方法，测定BAT组织的蛋白质。

1.4 酶活力测定

用中国科学院上海植物生理研究所研制的铂氧电极－溶氧测定仪测定组织的酶活性，细胞色素c氧化酶活性测定参考Sundin等（1987）的方法，反应温度30℃，反应杯内总体积3 mL。

1.5 数据处理

利用SPSS软件包，采用双因子方差分析（two-way ANOVA）和LSD多重比较等进行统计分析；数据均以平均值±标准差（mean±*SD*）表示，$P<0.05$被认为差异显著。

2 结 果

为避免体重的影响，本文采用Heusner（1984）的建议，以体重的2/3次幂（$W^{0.67}$）对结果进行校正。

2.1 组织蛋白含量

高原鼠兔的BAT组织蛋白受温度影响较大（ANOVA，$P<0.01$）（图1），长光照时，5℃比23℃总蛋白与校正体重后蛋白含量高121%和126%，短光照时5℃增加不显著（$P>0.05$）；短光照与长光照相比蛋白含量相对较高，23℃时差异显著（$P<0.01$），5℃增加不明显（$P>0.05$）。

2.2 线粒体蛋白含量

光周期对BAT线粒体蛋白含量具有显著影响（ANOVA，mg：$P=0.007$；mg/$g^{0.67}$BW：$P=0.009$），而温度对蛋白含量的影响则不显著（$P>0.05$）。最小显著性差异检验（LSD）表明，低温和短光照组的蛋白含量显著高于高温长光照组和低温长光照组（$P<0.05$）（图2）。长光照时，5℃与23℃相比，BAT线粒体蛋白含量增加63%，校正体重后增加59%；短光照时，5℃比23℃分别增加62%和55%；如果考虑光照影响，5℃时，短光照比长光照分别增加150%和141%，23℃时分别增加150%和147%；5℃短光照时分别是23℃长光照时的4.1倍和3.8倍。

2.3 细胞色素c氧化酶活性

光照和温度对细胞色素c氧化酶的活性具有显著影响（ANOVA，nmol O_2/min·g BAT：$P=0.003$；nmol O_2/min·$g^{0.67}$BW，$P<0.001$）。LSD检验表明，低温和短光照组的细胞色素c氧化酶活性显著高于其他3个处理组（$P<0.05$）（图3）。长光照时，5℃与23℃相比，每克BAT组织酶活力和校正体重后酶活力分别增加106%和45%；短光照时分别增加114%和159%；5℃时，短光照比长光照时高79%和298%；23℃时分别高73%和124%；5℃短光照是23℃长光照时的3.7倍和5.8倍。

3 讨 论

BAT在NST中的主导地位表明BAT参与了季节性产热驯化的过程。已有研究表明，冬季BAT线粒体密度、线粒体呼吸能力等均增加（Heldmaier等，1990），我们对高原鼠兔的工作也证明了这一点（王德华等，1989，1990；Wang等1996）。高原鼠兔

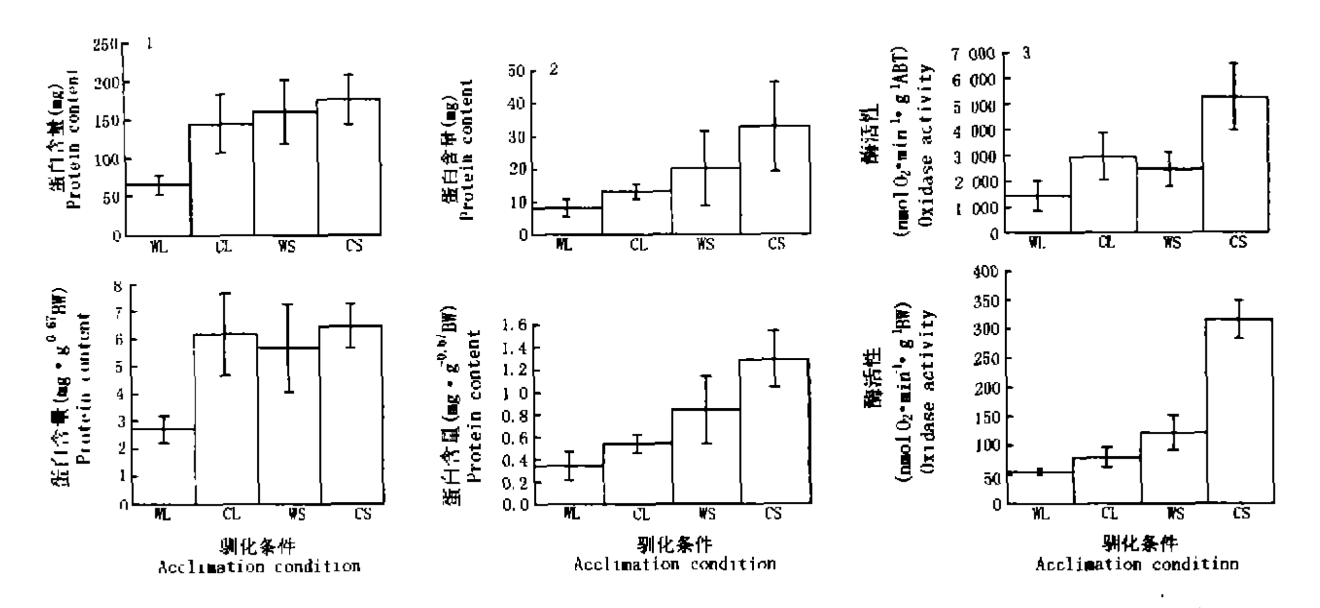


图 1～3 光照和温度对高原鼠兔 BAT 组织蛋白含量、线粒体蛋白含量和线粒体细胞色素 c 氧化酶活性的影响

Figs. 1－3 Effects of photoperiod and temperature on BAT protein contents, mitochodrial protein contents and cytochrome c oxidase activities in plateau pika

WL. 高温和长光照（23℃ and 16L：8D）；CL. 低温和长光照（5℃ and 16L：8D）；WS. 高温和短光照（23℃ and 8L：16D）；CS. 低温和短光照（5℃ and 8L：16D）；BW. 体重（body weight）。

在低温或短光照条件下，BAT 总蛋白均高于 23℃ 长光照的动物。5℃ 短光照时的总蛋白含量是 23℃ 长光照的 2.7 倍；线粒体总蛋白是 23℃ 长光照的 4.1 倍，细胞色素 c 氧化酶活性为 3.7 倍；组织蛋白、线粒体蛋白和细胞色素 c 氧化酶活性的最高值均出现于 5℃ 加短光照组，最低值见于 23℃ 加长光照组。因此，光照和温度是共同起作用的。

Heldmaier 等(1985)和 Rafael 等(1985)在对黑线毛足鼠的研究中发现，在短光照条件下，BAT 线粒体数量、线粒体蛋白、解偶联蛋白(UCP)增加，并认为这种影响在本质上与冷暴露的影响是相似的，但冷暴露导致增加的幅度较大。如长光照条件下，5℃ 冷驯化 BAT 酶活性增加 3 倍，GDP 结合增加 9 倍(Rafael 等，1985)。并发现 5℃ 短光照驯化比 5℃ 长光照对 NST 和 BAT 呼吸的影响要大(Heldmaier 等，1982；Rafael 等，1985)。我们的测定结果也表明，5℃ 加短光照可刺激 BAT 产热活性加强。在季节驯化过程中，黑线毛足鼠 BAT 线粒体蛋白含量增加约 10 倍(Rafael 等，1985)，林姬鼠(*Apodemus sylvaticus*)中 BAT 线粒体蛋白增加 3 倍，而 UCP 成分增加 30 倍(Klaus 等，1988)。这也说明 BAT 结构和生化调节，尤其是线粒体解偶联特点的加强，构成了季节性产热驯化的分子基础。Wiesinger 等(1989)进一步研究发现，长期冷暴露加短光照可使黑线毛足鼠 NST 发展最大，最大 NST 与季节驯化中冬季的 NST 结果相似，且 BAT 产热特征的适应性变化要比 NST 本身程度要大。如 5℃ 短光照与 23℃ 长光照相比，总线粒体蛋白含量增加 10.5 倍，总 GDP－结合(GDP-binding)增加 35 倍。

Horwitz(1989)认为，短光照时，对线粒体 GDP 结合的影响与冷条件下不相同，如雄性叙利亚仓鼠(实验动物)和雄性黑线毛足鼠冷驯化时，GDP－结合增强，而短光照则不具这种作用，但低温加短光照可使线粒体蛋白和 GDP 结合进一步增强，并认为两种环境因子的作用途径并不相同。而 Heldmaier 等(1989)认为，短光照可刺激黑线毛足鼠 BAT 的呼吸酶活力、线粒体蛋白及线粒体 UCP 增加。在姬鼠和欧䶄(*Clethrionomys glareolus*)中也发现相似的现象。因此短光照可诱导 BAT 细胞的结构和生化特性改变，并认为尽管短光照引起的变化比冷暴露引起的变化要小一些。但与冷驯化的反应在本质上是相同的，即冷暴露和短光照的影响都是通过相同的神经或内分泌途径作用于 BAT 细胞。

对于短光照和冷暴露的作用机制，目前意见尚不一致。Heldmaier 等(1989)认为寒冷和短光照可以互相替代，以作为产热驯化的信号。通过对黑线毛足鼠脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase，LPL)的研究表明，短日照也可促进冷暴露驯化过程。而 Klin-

genspor 等(1989)研究后认为,短光照和环境温度共同作用以作为产热特征季节驯化的信号。我们的结果也表明,温度和光照共同作用,诱导 BAT 线粒体产热活性的变化调节。

从这些研究中可以认为,小哺乳动物利用光周期作为产热季节驯化的环境信号,但这种反应的生理学并不十分明了(Heldmaier 等,1989)。一般认为光周期控制可能以两种方式起作用:短光照可能直接增加 BAT 产热能力,或者可能诱导准备性调节以进一步促进冷驯化过程。短光照的这种促热反应受松果体及其激素褪黑激素(melatonin)的控制(Heldmaier 等,1986)。

在线粒体水平上,低温和短光照可刺激高原鼠兔的蛋白含量增加;促进细胞色素 c 氧化酶活性增强。因此高原鼠兔在产热能力的季节驯化过程中,环境温度和光照都是重要的调节信号,两个因子联合作用诱导动物的产热变化。这可能与其栖息特点有关。高原鼠兔喜栖于开阔的蒿草草甸中,隐蔽性差,同时由于高寒地区的昼夜温差大、风速大以及高原鼠兔不筑巢、群居性较差等特点,使得其对温度的变化较敏感。但由于高寒地区气候多变,有时单靠温度并不能反映气候的季节变化,因此温度加光照可使动物准确地判断季节变化,适时进行生理调节以确保自身的生存。从生境选择的进化角度分析,栖息生境及其生活习性在适应性产热的季节驯化过程中可能起很重要的作用。

参 考 文 献

王德华,王祖望,1989. 小哺乳动物在高寒环境中的生存对策Ⅰ.高原鼠兔和根田鼠褐色脂肪组织(BAT)重量和显微结构的季节性变化[J]. 兽类学报,9(3):176~185. [Wang D H, Wang Z W, 1989 Strategies for survival of small mammal in a cold alpine environment Ⅰ. Seasonal variations in the weight and structure of brown adipose tissue in *Ochotona curzoniae* and *Microtus oeconomus*. *Acta Theriologica Sinica*, 9(3):176-185.]

王德华,王祖望,1990. 小哺乳动物在高寒环境中的生存对策Ⅱ.高原鼠兔和根田鼠非颤抖性产热(NST)的季节性变化[J]. 兽类学报,10(1):40~53. [Wang D H, Wang Z W, 1990. Strategies for survival of small mammals in a cold alpine environment Ⅱ. Seasonal changes in the capacity of nonshivering thermogenesis in *Ochotona curzoniae* and *Microtus oeconomus*. *Acta Theriologica Sinica*, 10(1):40-53.]

王德华,王祖望,1992. 褐色脂肪组织及其产热研究进展[J]. 生态学杂志,11(3):43~48. [Wang D H, Wang Z W, 1992. Brown adipose tissue and its thermogenesis: a review. *Chinese J. Ecology*, 11(3):43-48.]

王德华,刘晓达,王祖望等,1993a. 高原鼠兔褐色脂肪组织成分与功能的季节动态[J]. 兽类学报,13(4):271~276[Wang D H, Liu X D, Wang Z W *et al*, 1993a. Seasonal dynamics of composition and function of brown adipose tissue for plateau pika. *Acta Theriologica Sinica*, 13(4):271-276.]

王德华,孙儒泳,王祖望,1993b. 高原鼠兔蒸发失水的地位及热能调节[J]. 兽类学报,13(2):104~113. [Wang D H, Sun R Y, Wang Z W, 1993. Evaporative water loss and thermoregulation in plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Theriologica Sinica*, 13(2):104-113.]

王德华,孙儒泳,王祖望等,1996. 根田鼠冷驯化过程中的适应性产热特征[J]. 动物学报,42(4):369~376. [Wang D H, Sun R Y, Wang Z W *et al*, 1996. Adaptive thermogenic properties during cold exposure in root vole. *Acta Zoologica Sinica*, 42(4):369-376.]

Feist D D, Morrison P R, 1981. Seasonal changes in metabolic capacity and noreponephrine thermogenesis in the Alaskan red-backed vole: environmental cues and annual differences[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 69:697-700.

Feist D D, Feist C F, 1986. Effects of cold, short day and melatonin on thermogenesis, body weight and reproductive organs in Alaskan red-backed voles[J]. *Journal of Comparative Physiology*, B 156:741-746.

Hagelstein K A, Folk G F Jr, 1978. Effects of photoperiod, cold acclimation and melatonin on the white rat[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 62:225-229.

Haim A, Fourie F R, 1980. Heat production in cold and long scotophase acclimated and winter acclimatized rodents [J]. *International Journal of Biometeorology*, 24:231-236.

Haim A, 1982. Effects of long scotophase and cold acclimation on heat production in two diurnal rodent [J]. *Journal of Comparative Physiology*, 148:77-81.

Heldmaier G, Steinlechner S, Rafael J *et al*, 1981. Photoperiod control and effects of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue[J]. *Science*, 212:917-919.

Heldmaier G, Steinlechner S, Rafael J *et al*, 1982. Photoperiod and ambient temperature as environmental cues for seasonal thermogenic adaptation on the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*[J]. *International Journal of Biometeorology*, 26:339-345.

Heldmaier G, Buchberger A, 1985. Sources of heat during nonshivering thermogenesis in Djungarian hamsters: a dominant role of brown adipose tissue during cold acclimation[J]. *Journal of Comparative Physiology*, 156:237-245.

Heldmaier G, Lynch G R, 1986. Pineal involvement in thermoregulation and acclimatization[J]. *Pineal Research Reviews*, 4:97-139.

Heldmaier G, Steinlechner S, Ruf T *et al*, 1989. Photoperiod and thermoregulation in vertebrate: body temperature rhythms and thermogenic acclimation[J]. *Journal of Biological Rhythms*, 4:251-265.

Heldmaier G, Klaus S, Wiesinger H, 1990. Seasonal adaptation of thermoregulatory heat production in small mammals[A]. In: Bligh J, K Voigy (eds) Thermoreceptors and temperature regulation, USA [M]. 235-243.

Heusner A A, 1984. Biological similitude: statistical and functional relationships in comparative physiology[J]. *American Journal of Physiology*, 15R:839-845.

Himms-Hagen J, 1989. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity [J]. *Progress in Lipid Research*, 28:67-115.

Horwitz B A, 1989. Biochemical mechanisms and control of cold-induced

cellular thermogenesis[A]. In: Wang LCH (ed). Advances in comparative and environmental physiology Ⅳ [M]. Springer-Verlag. 83 - 116.

Klaus S, Heldmaier G, Ricpuier D, 1988. Seasonal acclimation of bank vole and wood mice: nonshivering thermogenesis and thermogenic properties of brown adipose tissue mitochondria [J]. *Journal of Comparative Physiology*, B **158**: 157 - 164.

Kingenspor M, Klaus S, Wiesinger H *et al*, 1989. Short photoperiod and cold activate brown fat lipoprotein lipase in the Djungarian hamster [J]. *American Journal of Physiology*. , **257**R: 1123 - 1127.

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J] *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265 - 275.

Lynch G R, White S E, Grundel R *et al*, 1978. Effect of photoperiod, melatonin administration and thyroid block on spontaneous daily torpor and temperature regulation in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus* [J]. *Journal of Comparative Physiology*, B **125**: 157 - 163.

Rafael J, Vsiansky P, 1985. Photoperiodic control of the thermogenic capacity in brown adipose tissue of the Djungarian hamster [J]. *Journal of Thermal Biology*, **10**: 167 - 170.

Sundin U, Moore G, Nedergaard J *et al*, 1987. Thermogenin amount and activity in hamster brown fat mitochondria: effect of cold acclimation [J]. *American Journal of Physiology*, **252**: R822 - R832.

Wang Dehua, Wang Zuwang, 1996. Seasonal variations in energy requirements and thermogenesis in plateau pikas and root voles [J]. *Acta Theriologica* (Poland), **41**: 225 - 236

Wiesinger H, Hildmaier G, Buchberger A, 1989. Effect of photoperiod and acclimation temperature on nonshivering thermogenesis and GDP-binding of brown fat mitochondria in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus* [J]. *Pflugers Arch*, **413**: 667 - 672

Wunder B A, 1985 Energetics and thermoregulation [A]. In: Tamarin R H (ed). Biology of new world *Microtus* [M]. Special Publication No. 8. American Society of Mammalogists. 812 - 844.

Zegers D A, Merritt J F, 1988. Effect of photoperiod and ambient temperature on nonshivering thermogenesis of *Peromyscus maniculatus* [J]. *Acta Theriologica* (Poland), **33**: 273 - 281.

EFFECTS OF PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE ON BROWN ADIPOSE TISSUE THERMOGENIC PROPERTIES IN PLATEAU PIKA

WANG De-hua SUN Ru-yong[①] WANG Zu-wang

(*Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080 *wangdh@panda.ioz.ac.cn*)

Abstract: We examined the effects of temperature and photoperiod on the thermogenic characteristics of brown adipose tissue in plateau pikas (*Ochotona curzoniae*). Pikas were acclimated in the following groups: ①Long day-warm temperature (16 L:8 D, 23 ℃); ②Long day-cold temperature (16 L:8 D, 5℃); ③short day-warm temperature (8 L:16 D, 23℃); and ④short day-cold temperature (8 L:16 D, 5℃). Both temperature and photoperiod were important environmental cues for changes in thermogenesis for pikas. Low temperature and/or short photoperiod induced increases in tissue protein contents, mitochondrial protein contents of brown adipose tissue, and cytochrome c oxidase activity of brown adipose tissue mitochondria in pika. Animal's habitat preference and behavioral properties play an important role in the seasoanl acclimazization of thermogenic characteristics. Our results showed that temperature and photoperiod combined induce thermogenic adjustments in plateau pika.

Key words: Plateau pika (*Ochotona curzoniae*), Brown adipose tissue (BAT), Mitochondria

① Beijing Normal University